

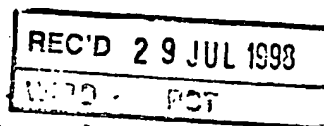
Please scan

PCT/EP 98/03356

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Bescheinigung

Die SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT in Berlin/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Thrombin hemmende Peptide"

am 6. Juni 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifika-
tion erhalten.

München, den 30. Juni 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Anzeichen: 197 24 791.1

J000

Thrombin hemmende Peptide

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide und deren Verwendung zur Herstellung von
5 Arzneimitteln.

Die Protease Thrombin hat eine Schlüsselrolle bei der Blutgerinnung. Sie spaltet Fibrinogen zu Fibrin, das dann ein Blutgerinnsel bildet. Dies führt unter physiologischen Bedingungen zu einem Blutungsstop und einem Wundverschluß.
10 Unter pathologischen Zuständen jedoch, wenn z.B. Gefäßschädigungen aufgrund von arteriosklerotischen Veränderungen oder bedingt durch einen Herzinfarkt vorliegen, kann es zu einem vollständigen Gefäßverschluß kommen. Dies äußert sich z.B. im Auftreten von Thrombosen oder einem Herzinfarkt. Deshalb werden Thrombininhibitoren zur Thrombosebehandlung eingesetzt.

Ein bekannter Thrombininhibitor ist das Protein Hirudin, das ursprünglich aus Blutegeln gewonnen wurde (Markwardt, F. (1957) Z. Physiol. Chem. 308, 147-156). Seine dreidimensionale Struktur im Komplex mit Thrombin ist bekannt (Rydel, T. J. et al. (1990) Science 249, 277-280). Ein ebenso wirksamer Inhibitor ist das aus einer
20 Raubwanze isolierte Triabin (Noeske-Jungblut, C. et al (1995) J Biol Chem 270, 28629-28634). Diese beiden Inhibitoren unterscheiden sich in ihrer Wirkungsweise. Während das Hirudin an zwei Stellen des Thrombins bindet, dem aktiven Zentrum und einer sogenannten Anionenbindungsstelle, bindet das Triabin nur an der Anionenbindungsstelle. Das aktive Zentrum wird in diesem Fall nicht blockiert; es wird
75 aber trotzdem die Fibrinogenspaltung inhibiert, da für die Spaltung die Bindung des Fibrinogens an diese Anionenbindungsstelle notwendig ist. Ein vom Hirudin abgeleitetes Peptid ist das Hirulog, das ebenso wie Hirudin das aktive Zentrum und die Anionenbindungsstelle des Thrombins blockiert. (Maraganore, J.M. und Bourdon, P. (1990) Biochemistry 29, 7095-7101). Es ist etwa 100-fach schwächer wirksam als das
30 Hirudin (J.M. Maraganore et al 1990, Biochemistry 29, 7095-7101).

In klinischen Studien hat sich gezeigt, daß Hirudin leicht überdosiert werden kann, (z. B. Studie TIMI 9A, Antman, E. M. (1994) Circulation 90, 1624-1630 oder Studie Gusto IIa (1994) Circulation 90, 1631-1637) und dann zu starken Blutungskomplikationen
35 führt. Präklinische Daten zeigen, daß Triabin eine andere Hemmkinetik aufweist. Ebenso wie Hirudin hemmt es bei niedrigen Konzentrationen, zeigt aber bei hohen Konzentrationen keine vollständige Hemmung der Gerinnung (s. Anwendungsbeispiel

1). Für den klinischen Einsatz würde das bedeuten, daß Triabin in einem breiteren Dosisbereich angewendet werden kann, ohne zu starken Blutungen zu führen. Der Nachteil des Triabins ist, daß es ein relativ großes Protein ist und deshalb intravenös verabreicht werden muß. Kleinere Peptide, die dieselben Eigenschaften besitzt wie das Triabin, würde deshalb den Vorteil haben, daß sie auch oral oder transdermal verabreicht werden können. Die weiteren Vorteile kleinerer Peptide bestehen darin, daß sie einfacher hergestellt werden können und damit billiger sind. Weitere Vorteile gegenüber großen Proteinen bestehen darin, daß kleinere Peptide bessere Lagereigenschaften aufweisen.

Es wurden nun Peptide der allgemeinen Formel I

Y¹-X¹-Ser-X²-Ser-X³-X⁴-Asn-Phe-X⁵-X⁶-X⁷-Y²-D-Tyr-X⁸-Val-X⁹-Glu-X¹⁰-X¹¹-X¹².
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Ser-X¹³-X¹⁴-Asp (I),
 22 23 24 25

in der

Y¹ Phe, Lys, Cys und Orn und
 Y² Asp, Cys und Glu sind, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über eine Seitenkette oder ein β -turn Mimetikum miteinander verknüpft sind und

X¹⁻¹⁴ eine beliebige Aminosäure darstellt, die über Seitenketten miteinander verbunden sein können, gefunden, die gegenüber den bekannten Peptiden bessere Eigenschaften aufweisen.

Bevorzugte Peptide der allgemeinen Formel I sind solche, in denen

Y¹ Phe, Lys, Cys und Orn und
 Y² Asp, Cys und Glu sind, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über eine Seitenkette oder ein β -turn Mimetikum miteinander verknüpft sind und
 X¹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn, Cit, β -Ala, homo-Cys, homo-Ser, Gaba, Can, β -CN-Ala, OH-Pro, OH-Lys, N-Met-Lys, Met-His, Desmosin und Djenkolsäure ist, die über Seitenketten miteinander verbunden sein können.

Besonders bevorzugte Peptide der allgemeinen Formel I sind solche, in denen

Y¹ Phe, Lys, Cys und Orn und

Y² Asp, Cys und Glu sind, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die
 5 Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über eine Seitenkette oder ein β -turn
 Mimetikum miteinander verknüpft sind und

X¹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu,
 Lys, Arg, His, Orn und Cit ist, die über Seitenketten miteinander verbunden sein
 können.

10

Insbesondere bevorzugt sind solche Peptide der allgemeinen Formel I,

in der

v¹ Lys, Cys und Orn und

15 Y² Asp, Cys und Glu sind, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und
 Y² die Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über eine
 Seitenkette miteinander verknüpft sind und

X⁶ und X⁸ Leu,

X⁷ Val und

20 X¹⁻⁵ und X⁹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn,
 Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind, wobei falls X⁴ für
 Glu und X¹⁰ für Lys steht, diese über eine Seitenkette miteinander
 verknüpft sind.

25

Insbesondere sind ferner solche Peptide der allgemeinen Formel I bevorzugt,

in der

Y¹ Lys und

30 Y² Asp ist, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die Bedeutung von Y¹
 hat, wobei Y¹ und Y² über ein β -turn Mimetikum miteinander verknüpft sind und

X¹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu,
 Lys, Arg, His, Orn und Cit ist, wobei, falls X⁴ für Glu und X¹⁰ für Lys steht, diese
 über eine Seitenkette miteinander verknüpft sind.

35

Davon insbesondere bevorzugt sind auch solche Peptide der allgemeinen Formel I,

- in der
- Y¹ Lys und
- 5 Y² Asp ist, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über ein β -turn Mimetikum miteinander verknüpft sind und
- X⁶ und X⁸ Leu,
- X⁷ Val,
- 10 X¹⁻⁵ und X⁹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind, wobei falls X⁴ für Glu und X¹⁰ für Lys steht, diese über eine Seitenkette miteinander verknüpft sind.

- 15 Die am meisten bevorzugten Peptide der allgemeinen Formel I sind

Lys-Ile-Ser-Val-Ser-Tyr-Asp-Asn-Phe-Ala-Leu-Val-Asp-D-Tyr-Leu-Val-Phe-Glu-Arg-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

- 20 Thr-Lys-Ser-Asp-Thr-Asp,
20 21 22 23 24 25

wobei das Lys in Position 1 mit dem Asp in Position 13 über eine Seitenkette verknüpft ist,

- 25 Lys-Ile-Ser-Val-Ser-Tyr-Glu-Asn-Phe-Ala-Leu-Val-Asp-D-Tyr-Leu-Val-Phe-Glu-Lys-Thr-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

- Lys-Ser-Asp-Thr-Asp,
30 21 22 23 24 25

wobei das Lys in Position 1 mit dem Asp in Position 13 und Glu in Position 7 mit Lys in Position 19 über eine Seitenkette verknüpft ist und

- 35 Lys-Ile-Ser-Val-Ser-Tyr-Glu-Asn-Phe-Ala-Leu-Val-Asp-D-Tyr-Leu-Val-Phe-Glu-Lys-Thr-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Lys-Ser-Asp-Thr-Asp,
21 22 23 24 25

5 wobei das Lys in Position 1 mit dem Asp in Position 13 durch ein β -turn Mimetikum und das Glu in Position 7 mit Lys in Position 19 über eine Seitenkette verknüpft sind.

Die erfindungsgemäßen Peptide kommen als pharmazeutische Wirkstoffe zur Anwendung und können alleine oder in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein oder mehrere Peptide der allgemeinen Formel I enthält,
10 zusammen mit pharmazeutisch geeigneten Lösungen und Trägern appliziert werden. Die erfindungsgemäßen Peptide können alleine, als Gemisch oder als Zusammensetzung gemeinsam mit pharmazeutisch geeigneten Lösungen und Trägern intravenös, subkutan, oral oder transdermal appliziert werden.

15 Die erfindungsgemäßen Peptide und deren Zusammensetzungen und Gemische können zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Thrombosen, instabiler Angina, Arteriosklerose, Prävention eines Wiederverschlusses von Gefäßen nach PTCA/ PTA oder nach Thrombolyse zur Behandlung eines Herzinfarktes oder zur Verhinderung der Blutgerinnung bei der Hämodialyse verwendet werden.
20 Die pharmazeutischen Wirkstoffe, Zusammensetzungen bzw. Gemische sowie deren Verwendungen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Geeignete Zusammensetzungen können nach an sich bekannten Verfahren hergestellt werden, wobei alle für eine Formulierung der Peptide in der Pharmazie verwendbaren Lösungen, Träger und Zusatzstoffe zum Einsatz kommen können (Remington's
25 Pharmaceutical Science, 15th Ed. Mack Publishing Company, East Pennsylvania, 1980).

Für den therapeutischen Einsatz kommen verschiedene Dosen in Frage. So hängt die applizierbare Dosis von dem jeweiligen Peptid, dem Individuum, der Applikationsart
30 (intravenös, subkutan, oral, transdermal) und von der Schwere der zu behandelnden Krankheit ab.

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt die Verlängerung der APTT durch die Inhibitoren Triabin und Hirudin.

5 Beschreibung der Abkürzungen

Ala = Alanin	DMSO = Dimethylsulfoxid
Val = Valin	DCM = Dichlormethan
Leu = Leucin	DPPF = Bis(diphenylphosphino)ferrocen
Ile = Isoleucin	DMF = Dimethylformamid
10 Pro = Prolin	DIPEA = Diisopropylethylamin
Phe = Phenylalanin	TBTU = Benzotriazolyl-tetramethyl- uroniumhexafluorborat
Trp = Tryptophan	HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol
Met = Methionin	TF4 = Trifluoressigsäure
Gly = Glycin	
15 Ser = Serin	
Thr = Threonin	
Cys = Cystein	
Tyr = Tyrosin	
Asn = Asparagin	
20 Gln = Glutamin	
Asp = Asparaginsäure	
Glu = Glutaminsäure	
Lys = Lysin	
Arg = Arginin	
25 His = Histidin	
Orn = Ornithin	
Cit = Citrullin	
β -Ala = β -Alanin	
homo-Cys = Homocystein	
30 homo-Ser = Homoserin	
Gaba = γ -Aminobuttersäure	
Can = Canavanin	
β -CN-Ala = β -Cyanoalanin	
OH-Pro = Hydroxyprolin	
35 OH-Lys = Hydroxylysin	
N-Met-Lys = N-Methyllysin	
Met-His = Methylhistidin	

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Voruntersuchungen und die Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide ohne diese auf die Beispiele zu beschränken.

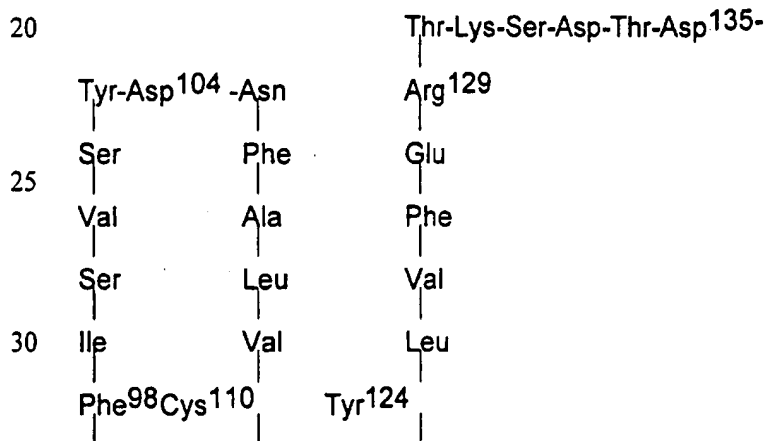
Beispiel 1

5

1. Bestimmung der Kristallstruktur eines Komplexes aus Thrombin und Triabin

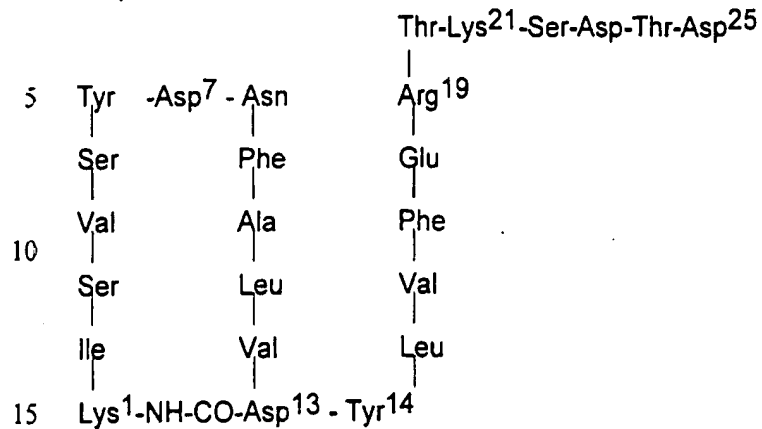
Gereinigtes Triabin und Thrombin wurden in 20 mM Natriumacetat, 25 mM Natriumchlorid, pH 5,5 zusammengegeben. In einem hängenden Tropfen, der 50 mM Natriumacetat, pH 4,7, 100 mM Ammoniumsulfat, 0,01% Natriumnitrit und 8% PEG 4000 enthält, bildeten sich Kristalle des Komplexes aus Triabin und Thrombin. Die Struktur der Kristalle wurde mittels Röntgenanalyse ermittelt. Aus diesen Strukturdaten wurden die Aminosäuren ermittelt, die Wechselwirkungen mit dem Thrombin eingehen. Es zeigte sich, daß diese Aminosäuren sich in Bereichen befinden, die eine β -Faltblattstruktur ausbilden.

Die Teilsequenzen des Triabins, die an Thrombin binden, lauten:



35 Durch gezielten Austausch einiger Aminosäuren und Verknüpfung der Sequenzen wurde ein Peptid entworfen, in dem die Aminosäuren ähnliche räumliche Abstände haben wie in den Teilsequenzen des Triabins, die an Thrombin binden. Im einzelnen wurde das Phenylalanin im Triabin an der Position 98 gegen Lysin ausgetauscht, das im Peptid nunmehr die erste Aminosäure darstellt. Das Cystein 110 im Triabin wurde im
40 Peptid durch Asparaginsäure ersetzt. Die Carboxylseitengruppe der Asparaginsäure ist mit der Aminoseitengruppe des Lysins (Position 1 im Peptid) verknüpft, so daß eine zyklische Verbindung entsteht. Die Asparaginsäure ist mit der zweiten Teilsequenz des

Triabins (124-135), die an Thrombin bindet, verbunden. Das Peptid hat folgende Sequenz:



Zunächst wurden Peptide entworfen, die diese Bereiche enthalten. Wichtig bei der Entwicklung der erfindungsgemäßen Peptide war die Nachahmung der dreidimensionalen Struktur der ursprünglichen Bereiche. Insbesondere mußte die β -Faltblattstruktur des Bereichs der Aminosäuren 98-103 (genannt Kette 1), Aminosäuren 105-110 (Kette 2) und der Aminosäuren 124-135 (Kette 3) sterisch stabilisiert werden. Dies konnte durch verschiedene Modifikationen der ursprünglichen Bereiche gemäß folgenden Ansätzen erzielt werden.

2. Stabilisierung der Peptide

A. Stabilisierung von Kette 1 und 2

Die Stabilisierung erfolgte entweder durch

1. Austausch der Aminosäuren Phenylalanin, im Triabin in Position 98, und/oder Cystein in Position 110 gegen Aminosäuren, die eine Verknüpfung über die Seitenkette erlauben (z.B. Lys-Asp, Cys-Cys, Ornithin-Glu) oder durch

2. Austausch des Cys¹¹⁰ gegen Asp und Verknüpfung von Phe⁹⁸ und diesem Asp durch ein " β -turn Mimetikum". Die Strukturen von β -turn Mimetika und ihre Anwendung sind ausführlich beschrieben in : U.Egner et al. (1997) Pesticide Science, in press.

B. Die Stabilisierung von Kette 2 und 3

Die Stabilisierung erfolgte entweder durch

1. Austausch des L-Tyr in Position 124 gegen ein D-Tyr (Konfigurationsisomer) und
 5 Verknüpfung der Aminosäuren in Position 110 (im Triabin Cys) mit der in Position 124 (im Triabin Tyr) durch eine Peptidbindung
 oder durch
2. Austausch des L-Tyr in Position 124 gegen ein D-Tyr und Verknüpfung der
 Aminosäure in Position 110 (im Triabin Cys) mit dem D-Tyr über ein "β-turn
 10 Mimetikum" wie in U. Egner et al.(1997) Pesticide Science, in press beschrieben.

C. Zusätzliche Stabilisierung

- Eine zusätzliche Stabilisierung der Ketten 2 und 3 kann erreicht werden durch
 15 Verknüpfung der Seitenketten der Aminosäuren 104 und 129. Dies kann z.B. durch
 Austausch von Asp104 durch Glu und Austausch von Arg129 durch Lys und
 Verknüpfung dieses Glu mit dem Lys durch die Seitenketten erfolgen.

- Durch Kombination der beschriebenen Ansätze zur Stabilisierung der Struktur können
 20 die verschiedenen erfindungsgemäßen Peptide synthetisiert werden.

Beispiel 2

25 Herstellung der Peptide

- Ein Peptid wurde anfangend vom C-Terminus (Asp25) nach der Merrifieldschen
 Festphasen-Methode mit Hilfe einer Peptid-Synthese-Maschine unter Benutzung der
 Fmoc-Chemie synthetisiert. Für die Zyklisierung mußten die Seitenketten des Lysins 1
 30 und der Asparaginsäure 13 selektiv geschützt werden, deshalb wurde für die Position
 1 N-α-1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl-N-ε-Fmoc-L-lysin (Dde-Lys)
 verwendet, während für das Lysin in Position 21 Boc-lysin(Fmoc) eingesetzt wurde.
 Für das Asp in Position 13 wurde Asp(O-All) und für die anderen Asp (O-tBu)-
 Asp(Fmoc) verwendet. Die Synthese gliederte sich in folgende Schritte:

35

1. Synthese des Peptids

Die Synthese erfolgte nach Standardmethoden in einer Peptid-Synthese Maschine von Applied Biosystems.

5 Sequenz: Lys-Ile-Ser-Val-Ser-Tyr-Asp-Asn-Phe-Ala-Leu-Val-Asp-D-Tyr-Leu-Val-Phe-Glu-Arg-Thr-Lys-Ser-Asp-Thr-Asp

2. Abspaltung der Dde und O-AlI Gruppen

10 Dazu wurde das Harz 2x mit DMSO/DCM (1:1) gewaschen und 30 min in dieser Lösung quellen lassen. Dann wurde Palladium (0.1 mol/mol Peptid) und DPPF (0.1mol/mol Peptid) und Essigsäure (10-facher Überschuß) zugegeben. $\text{Sn}(\text{Bu})_3\text{H}$ wurde in 5 Portionen (insgesamt 5-facher Überschuß) innerhalb von 10 min zugegeben. Die Mischung wurde 20 min gerührt, dann abgesaugt und mit DMSO/DCM und DCM gewaschen.

3. Zyklisierung

20 Das Harz wurde 30 min in DMF vorgequollen, dann wurde DIPEA (8-facher Überschuß), TBTU (2-facher Überschuß) und HOBT (2-fach) zugegeben und über Nacht gerührt. Das Harz wurde abgesaugt und mit DMF und Ether gewaschen.

4. Abspalten vom Harz und Abspalten der restlichen Schutzgruppen

Zum Harz wurden Phenol, Ethyldithiol, Thioanisol, H_2O und TFA gegeben und die Reaktionsmischung 4 Stunden bei 37°C gerührt. Das Peptid wurde mit tButylether gefällt, abzentrifugiert und unter Stickstoff getrocknet.

25

Die nachfolgenden Anwendungsbeispiele zeigen die Anwendung der erfindungsgemäßen Peptide im Vergleich zu den bekannten Proteinen Triabin und Hirudin ohne die Anwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen auf diese Beispiele zu beschränken.

5

Anwendungsbeispiel 1

Wirkung von Triabin und Hirudin auf die Blutgerinnung

- 10 Die Wirkung von Triabin und Hirudin auf die Blutgerinnung wurde durch Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastin-Zeit (APTT) gemessen. Dazu wurden 100 µl menschliches Citrat-Plasma, 10 µl Inhibitor (Triabin oder Hirudin) und 100 µl APTT-Reagenz (Pathromtin von der Firma Behring) für 3 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl einer 25 mM CaCl₂ Lösung wurde die Zeit bis zur Gerinnungsbildung
15 gemessen. Die Messung erfolgte in einem Fibrometer der Firma Sarstedt. Die Ergebnisse werden angegeben in Verlängerung der Gerinnungszeit, die ohne Zusatz von Inhibitor gemessen wurde.

20 **Anwendungsbeispiel 2**

- Nach der gleichen Methode (APTT) wie unter Anwendungsbeispiel 1 beschrieben wurde auch die Wirkung der erfindungsgemäßen Peptide auf die Blutgerinnung gemessen. Als Inhibitor wurde eine Lösung des in Beispiel 2 genannten Peptids in
25 einer Konzentration von 0,1 - 100 µM zugesetzt. Anschließend wurde die Verlängerung der Gerinnungszeit wie oben beschrieben gemessen.

Patentansprüche

1. Peptide der allgemeinen Formel I

Y¹-X¹-Ser-X²-Ser-X³-X⁴-Asn-Phe-X⁵-X⁶-X⁷-Y²-D-Tyr-X⁸-Val-X⁹-Glu-X¹⁰.
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

X¹¹-X¹²-Ser-X¹³-X¹⁴-Asp (I),
 20 21 22 23 24 25

in der

Y¹ Phe, Lys, Cys und Orn und

Y² Asp, Cys und Glu sind, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über eine Seitenkette oder ein β -turn Mimetikum miteinander verknüpft sind und

X¹⁻¹⁴ eine beliebige Aminosäure darstellt, die über Seitenketten miteinander verbunden sein können.

2. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß Anspruch 1, in der

Y¹ Phe, Lys, Cys und Orn und

Y² Asp, Cys und Glu sind, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über eine Seitenkette oder ein β -turn Mimetikum miteinander verknüpft sind und

X¹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn, Cit, β -Ala, homo-Cys, homo-Ser, Gaba, Can, β -CN-Ala, OH-Pro, OH-Lys, N-Met-Lys, Met-His, Desmosin und Djenkolsäure ist, die über Seitenketten miteinander verbunden sein können.

3. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1-2, in der

Y¹ Phe, Lys, Cys und Orn und

Y² Asp, Cys und Glu sind, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über eine Seitenkette oder ein β -turn Mimetikum miteinander verknüpft sind und

X¹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit ist, die über Seitenketten miteinander verbunden sein können.

5 4. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1-3, in der

Y¹ Lys, Cys und Orn und
 Y² Asp, Cys und Glu sind, und auch Y¹ die Bedeutung von Y²,
 und Y² die Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über
 10 eine Seitenkette miteinander verknüpft sind und
 X⁶ und X⁸ Leu,
 X⁷ Val und
 X¹⁻⁵ und X⁹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr,
 Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind, wobei
 15 falls X⁴ für Glu und X¹⁰ für Lys steht, diese über eine
 Seitenkette miteinander verknüpft sind.

5. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1-4, in der
 20 Y¹ Lys und
 Y² Asp ist, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die Bedeutung von
 Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über ein β -turn Mimetikum miteinander verknüpft
 sind und
 X¹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln,
 25 Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit ist, wobei, falls X⁴ für Glu und X¹⁰
 für Lys steht, diese über eine Seitenkette miteinander verknüpft sind.

6. Verbindungen der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1-5, in der
 30 Y¹ Lys und
 Y² Asp ist, und auch Y¹ die Bedeutung von Y², und Y² die
 Bedeutung von Y¹ hat, wobei Y¹ und Y² über ein β -turn
 Mimetikum miteinander verknüpft sind und
 X⁶ und X⁸ Leu,
 35 X⁷ Val,
 X¹⁻⁵ und X⁹⁻¹⁴ Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr,
 Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn und Cit sind, wobei

falls X⁴ für Glu und X¹⁰ für Lys steht, diese über eine Seitenkette miteinander verknüpft sind.

7. Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1-6, der Strukturen

5

Lys-Ile-Ser-Val-Ser-Tyr-Asp-Asn-Phe-Ala-Leu-Val-Asp-D-Tyr-Leu-Val-Phe-Glu-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

10

Arg-Thr-Lys-Ser-Asp-Thr-Asp,
19 20 21 22 23 24 25

wobei das Lys in Position 1 mit dem Asp in Position 13 über eine Seitenkette verknüpft ist,

15

Lys-Ile-Ser-Val-Ser-Tyr-Glu-Asn-Phe-Ala-Leu-Val-Asp-D-Tyr-Leu-Val-Phe-Glu-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

20

Lys-Thr-Lys-Ser-Asp-Thr-Asp,
19 20 21 22 23 24 25

wobei das Lys in Position 1 mit dem Asp in Position 13 und Glu in Position 7 mit Lys in Position 19 über eine Seitenkette verknüpft ist und

25

Lys-Ile-Ser-Val-Ser-Tyr-Glu-Asn-Phe-Ala-Leu-Val-Asp-D-Tyr-Leu-Val-Phe-Glu-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

30

Lys-Thr-Lys-Ser-Asp-Thr-Asp,
19 20 21 22 23 24 25

wobei das Lys in Position 1 mit dem Asp in Position 13 durch ein β -turn Mimetikum und das Glu in Position 7 mit Lys in Position 19 über eine Seitenkette verknüpft sind.

35

8. Ein Peptid der allgemeinen Formel I, nach einem der Ansprüche 1-7, als pharmazeutischer Wirkstoff.

9. Eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein oder mehrere Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1-7, zusammen mit pharmazeutisch geeigneten Lösungen und Trägern enthält.
- 5 10. Eine intravenös, subkutan, oral oder transdermal applizierbare Zusammensetzung, die ein oder mehrere Peptide der allgemeinen Formel I, gemäß den Ansprüchen 1-7, zusammen mit pharmazeutisch geeigneten Lösungen, Trägern und Zusatzstoffen enthält.
- 10 11. Verwendung der Peptide gemäß den Ansprüchen 1-8 und deren Zusammensetzungen gemäß den Ansprüchen 9 und 10 oder deren Gemische, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Thrombosen, instabiler Angina, Arteriosklerose, Prävention eines Wiederverschlusses von Gefäßen
15 nach PTCA/ PTA, nach Thrombolyse zur Behandlung eines Herzinfarktes oder zur Verhinderung der Blutgerinnung bei der Hämodialyse.

Zusammenfassung

Es werden Peptide der allgemeinen Formel I

5 Y¹-X¹-Ser-X²-Ser-X³-X⁴-Asn-Phe-X⁵-X⁶-X⁷-Y²-D-Tyr-X⁸-Val-X⁹-Glu-X¹⁰-X¹¹-X¹².
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

Ser-X¹³-X¹⁴-Asp (I),
 22 23 24 25

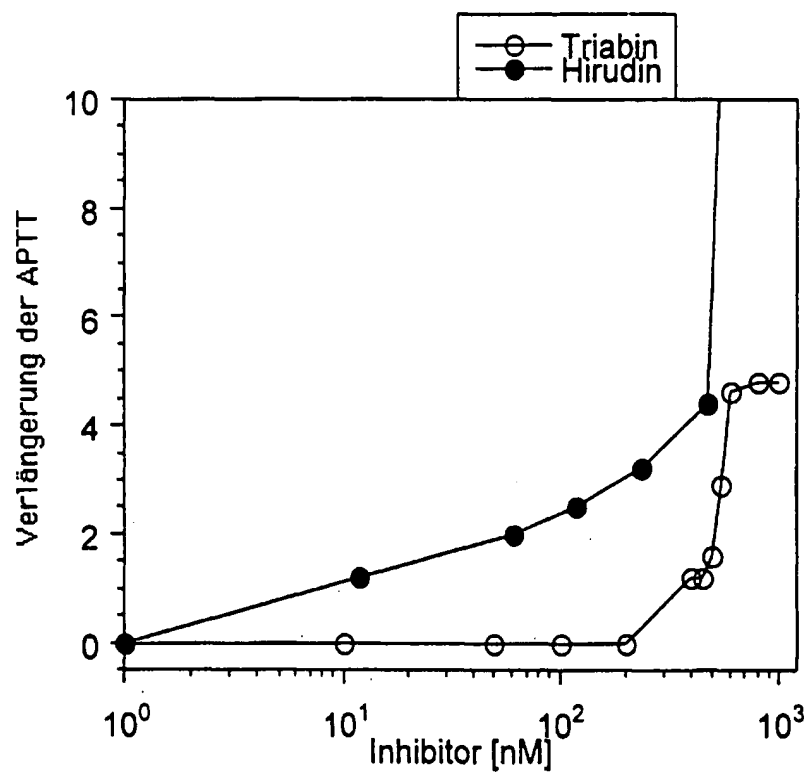
10

in der Y¹, Y² und X¹⁻¹⁴ die in der Beschreibung genannten Bedeutungen haben und deren Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln beschrieben.

5

10

Verlängerung der APTT durch Triabin und Hirudin



15 Fig. 1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.